

Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Wendebach-
Krankenhauses Berlin-Tempelhof

Chefarzt: Professor Dr. med. Wolfdietrich Germer

**„Einfluß alternierender Temperaturschwankungen
auf die Parasynchronisation
von HeLa-Zellen in Gewebekulturen“.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lorenz, Peter

aus Berlin

1963



Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Wenckebach-
Krankenhauses Berlin-Tempelhof
Chefarzt: Professor Dr. med. Wolfdietrich G e r m e r

"Einfluß alternierender Temperaturschwankungen auf die
Parasynchronisation von HeLa-Zellen in Gewebekulturen".

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Lorenz, Peter

aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

Referent: Professor Dr. med. Wolfdietrich G e r m e r

Korreferent: Professor Dr. med. Willy S c h w a r z



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20. APRIL 1963

E I N L E I T U N G

Eine Zelle durchläuft während eines Generationszyklus mehrere Phasen, die mit charakteristischen Veränderungen des Zellstoffwechsels einhergehen. In einer Zellpopulation existieren stets Zellen nebeneinander, die in verschiedenen Phasen der Entwicklung stehen (ZEUTHEN et al. 1954, HOTCHKISS 1954). Eine natürliche Synchronisation findet sich in Syncytien, bei verschiedenen Plasmodien, in spermatogenem Gewebe sowie im befruchteten Insektenei (ZEUTHEN et al. 1954, SWANN 1958). ZEUTHEN (1953) stellte bei einzelnen Zellen von *Tetrahymena pyriformis* ebenfalls ein über mehrere Generationen synchrones Verhalten fest.

Um Untersuchungen des Zellstoffwechsels durchführen zu können, verwendeten viele Autoren Zellkulturen, bei denen durch Mitosehemmung eine Synchronisation herbeigeführt worden war. Eine Kultur ist dann völlig synchronisiert, wenn sich zu jeder Zeit alle Zellen auf derselben Entwicklungsstufe befinden (CAMPBELL 1957). Eine künstliche Hemmung der Mitose kann durch Veränderung der Umgebungsfaktoren auf verschiedenen Wegen erreicht werden.

Über die Einwirkung von Strahlen auf die Zellteilungsvorgänge berichteten BEAM et al. 1954, LOVELESS 1954, SPOERL et al. 1954, LEA 1955, PUCK et al. 1955 und KATCHMAN et al. 1959.

Chemische Methoden der Mitosehemmung wurden von RAPKINE (1931), CHALKLEY et al. (1932), BARBER et al. (1943), NICKERSON (1948), HUGHES (1950), HUTCHENS et al. (1952), OGUR et al. (1953), LOVELESS (1954), BRACHET (1955) und KATCHMAN et al. (1959) beschrieben.

Eine Beeinflussung der Zellteilung durch den Entzug essentieller Nahrungsfaktoren für eine begrenzte Zeit berichteten JACOBY et al. (1937), HEGARTY (1939), JEENER et al. (1952), OGUR et al. (1953), ROGERS et al. (1930), STEARNS (1953), BARNER et al. (1954, 1955 und 1956), EARLE (1954), COHEN et al. (1954), CAMPBELL

(1956 und 1957), SCOTT et al.(1956 und 1958) und KJELD-GARD (1958).

Da sich die Größe der Zellen im Verlaufe der Entwicklungsphasen ändert, konnte von ADOLPH et al.(1932), HERSHEY et al.(1938), PRESCOTT (1955) und MARUYAMA et al.(1955 und 1956) einerseits durch optische Auswahl, andererseits durch Zentrifugation eine Trennung der verschiedenen Zellen durchgeführt werden.

Gezielte Lichteinwirkung auf lichtempfindliche Mikroorganismen führte nach TAMYA et al. (1953), NIHEI et al.(1954) und PIRSON (1957) zu synchronem Verhalten der Kulturen.

Respiratorische Hemmung des Zellstoffwechsels wurde durch Sauerstoffentzug (WAYMOUTH 1952) und durch Substanzen, die die eisenhaltigen Atmungsfermente hemmen (CN^- , CO, Azide, SWANN 1954)), erreicht.

Viele Autoren haben die Einwirkung von Temperaturveränderungen auf Zellpopulationen beschrieben. Über diese Einflüsse auf Kulturen von Mikroorganismen berichteten u. a. GERASSIMOW (1902), BAYNE-JONES et al.(1932), BELEHRADEK (1935), DAWSON et al. (1937), HEGARTY et al.(1940), JAMES (1950), SCHERBAUM et al.(1954), ZEUTHEN et al.(1954), LARK et al.(1954), MAALØE et al.(1954), HOTCHKISS (1954), MAZIA et al. (1954), SZYBALSKI et al.(1955), LARK (1955), FALCONE et al.(1956), MUCIBABIC (1956), HUNTER-SZYBALSKA et al.(1956) und SCOTT et al.(1958).

Die Temperatureinwirkung auf tierische Zellen und Gewebe wurde von LAMBERT (1913), LAMBERT et al.(1913), SPEAR (1928), KOKOTT (1930), BUCCIANTE (1928), BARBER et al.(1943), HOFFMANN et al.(1954), CHEVREMONT-COMHAIRE et al.(1956), FREDERIC (1956) und FIRKET (1956) beschrieben.

Zusammenfassende Arbeiten über die Methoden der Mitosehemmung wurden von SWANN (1954, 1957 und 1958), WAYMOUTH (1952), DeLAMATER (1956), CAMPBELL (1957), ZEUTHEN (1958) und SCHERBAUM (1960) veröffentlicht.

In HeLa-Zellkulturen, die ursprünglich

von einem menschlichen Cervikalkarzinom stammen, sind von GEY et al.(1954) nach einer Kälteperiode synchrone Teilungen erzielt worden. In den letzten Jahren verwendeten WILDY et al.(1958), NEWTON et al.(1959) und STOKER et al.(1959) HeLa-Zellen für Unterkühlungsversuche.

Ziel der hier durchgeführten Versuche war es, durch Temperaturbehandlung eine möglichst weitgehende Synchronisation der Zellteilungen während der nachfolgenden Inkubation zu erreichen. Die Versuche wurden an HeLa-Zellen in Gewebekulturen durchgeführt. Es wurde der Einfluß von Kälteschocks verschiedener Dauer und von alternierender Temperaturbehandlung auf den Ablauf der Mitosen sowie auf den Synchronisationseffekt untersucht.

A L L G E M E I N E M E T H O D E

I Methodik der Gewebekultur: Zur Verwendung kam der dauerpassagierbare epitheliale HeLa-Zellstamm S₃, der im hiesigen Laboratorium über 200 Kulturpassagen gehalten wurde. Die HeLa-Zellen wurden bei 37°C in Vierkantflaschen angezüchtet. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage gewechselt, nach vier Tagen wurde eine Passage vorgenommen.

a) Wechsel des Nährmediums: Die Vierkantflaschen wurden zunächst leicht geschüttelt, um abgestorbene Zellen aus dem Verband herauszulösen. Das Nährmedium (15 ml) wurde abpipettiert und durch eine gleiche Menge Medium ersetzt. Danach wurden die Vierkantflaschen mit sterilen Gummistopfen verschlossen und weiter bei 37°C inkubiert.

b) Passage der Zellen: Vor der Passage wurde die Kultur einer mikroskopischen Kontrolle unterzogen, nur gleichmäßig ausgewachsene Kulturen wurden verwendet. Das Nährmedium wurde abpipettiert, die Zellen wurden einmal mit 10 ml eines Trypsin-Versen-Gemisches gewaschen, anschließend wurden erneut 10 ml eines Trypsin-Versen-Gemisches einpipettiert. Nach einer Einwirkungszeit von drei bis vier Minuten lösten sich

die Zellen von der Glaswand. Durch leichtes Schütteln konnte dieser Prozeß mechanisch unterstützt werden. Die Zellsuspension wurde in ein Spitz-Zentrifugenglas überführt und für drei Minuten in Eiswasser kaltgestellt, um die Trypsineinwirkung zu unterbrechen. Danach wurde für fünf Minuten bei 500 UPM zentrifugiert, um die abgelösten Zellen zu sedimentieren. Der Überstand (Trypsin-Versen-Gemisch) wurde verworfen. Die Zellen wurden durch mehrfaches Hin- und Herpipettieren in 5 ml Nährmedium resuspendiert. Durch Hinzufügen von Nährmedium wurde eine Zelldichte eingestellt, die eine Kulturpassage im Verhältnis 1:2 ermöglichte. Mit dieser Suspension wurden entweder Vierkantflaschen zur Stammhaltung oder mit Deckgläschen versehene Petrischalen für Versuchszwecke beschickt. Die Züchtung der Gewebekulturen in den Petrischalen erfolgte in einem Inkubationsgefäß (nach DIFENTHAL et al. 1961) bei 5% CO₂ in Luft und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

II Zusammensetzung der Medien:

- 1) Das Nährmedium setzte sich aus Earle'scher Lösung, Lactalbuminhydrolysat und Yeastolate zusammen. Auf 1 l Earle'sche Lösung wurden 2,4 g Yeastolate (Difco) und 6 g Lactalbuminhydrolysat (NBCO) gegeben, sodaß nach Zusatz von 20% Kälberserum eine Endkonzentration von 0,2% Yeastolate und 0,5% Lactalbuminhydrolysat erreicht wurde.

- 2) Zusammensetzung der Earle'schen Lösung:

Kochsalz (NaCl)	6,8
Kaliumchlorid (KCl)	0,4
Kalziumchlorid (CaCl ₂ · 6 H ₂ O)	0,2
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	0,2
Primäres Natriumphosphat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	0,14
Glukose	1,0
Aqua dest.	ad 1 000.

- 3) Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):

NaCl	8,0
KCl	0,2

Sekundäres Natriumphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	- 1,15
Primäres Kaliumphosphat (KH_2PO_4)	0,2
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1
Aqua dest.	ad 1 000.

- 4) T r y p s i n (NBCO: 1:300): 0,2% ige Lösung in PBS.
- 5) T r y p s i n - V e r s e n : 8 Teile 0,2% ige Trypsinlösung + 2 Teile $\frac{m}{10}$ Titriplex III (Merck).
- 6) S t e r i l i s a t i o n der Salz- und Trypsinlösungen durch Seitzfilter (EKS), des Titriplex III durch eine Glasfritte G₅.

III Glaswaren: Sämtliche Glaswaren bestanden aus Geräteglas 20.

Für die Züchtung wurden Petrischalen von der Firma Anumba mit einem Durchmesser von 6 cm beziehungsweise 9 cm verwendet. Die Vorbereitung der Glaswaren wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 1) Säuern für 12 Stunden in einem 1:1 Salpetersäure-Schwefelsäuregemisch
- 2) Spülen in fließendem Leitungswasser für 24 Stunden
- e) einmal Spülen in 0,5% iger NaHCO_3 - Lösung
- 4) 15 mal Spülen in warmem fließendem Leitungswasser
- 5) zweimal Spülen in Aqua dest.
- 6) 15 Minuten Trocknen in Heißluft bei 140°C
- 7) Sterilisation der Glaswaren im Trockenschrank, 90 Minuten bei 160°C.

IV Gummiwaren: Die weißen Gummistopfen wurden vor der ersten Benutzung mit $\frac{n}{10}$ Natronlauge, anschließend mit $\frac{n}{10}$ HCl je 10 Minuten gekocht.

V Methodik der Färbung: Die Präparate wurden zum Teil nach H-E, zum Teil nach Feulgen gefärbt.

- 1) Fixierung: Spülen in PBS
Fixieren für 15 Minuten in einem For-

mol-Alkohol-Gemisch: 1 Teil 40% iges Formol, 9 Teile Alkohol abs.,
Überführen für je eine Minute in die absteigende Alkoholreihe (96%, 90%, 70%, 50%).

- 2) H-E-Färbung: Einbringen der Präparate für fünf Minuten in Aqua dest.,

10 Minuten Aufenthalt in Hämalau nach Böhmer,
Überführen in HCl-Alkohol,
Bläuen in Leitungswasser,
Gegenfärbung für eine Minute in 0,1% igem wässrigem Erythrosin (Merck).

- 3) Entwässerung erfolgte durch die aufsteigende Alkoholreihe, anschließend Einbringen der Präparate in Xylol und Einbetten in Caedax.

- 4) Feulgen-Färbung: Die Präparate wurden wie bereits beschrieben fixiert und durch die absteigende Alkoholreihe in Aqua dest. überführt, kurzes Eintauchen in n HCl von Zimmertemperatur, 10 Minuten Hydrolyse in n HCl von 60°C, Eintauchen in kalte n HCl, Unterbrechung der Hydrolyse durch einstündige Behandlung mit Schiff'schem Reagenz, dreimal je fünf Minuten Spülen in SO₂-Wasser, 15 Minuten Spülen in fließendem Leitungswasser, Überführen durch die aufsteigende Alkoholreihe ins Xylol und Eindecken in Caedax.

Zur Zubereitung des SO₂-Wassers wurden 3 g Natriumpyrosulfit (Na₂S₂O₅) in 30 ml n HCl und in 30 ml Leitungswasser gelöst, dazu wurden 540 ml Leitungswasser hinzugefügt. Das Schiff'sche Reagenz wurde nach dem Rezept von LILLIE hergestellt.

VI Allgemeine Methode der Versuchsdurchführung:

- 1) Transport der Petrischalen: Zur Durchführung der Temperaturbehandlung mußten die Kulturen über eine kürzere Strecke zwischen der Brutkammer und dem Kühlschrank transportiert wer-

den. Hierfür wurden runde Aluminiumplatten verwendet, die in der Mitte mit einem Stiel versehen waren, an dem sich ein Griff befand. Mit diesen Platten, die in die Begasungsgefäße paßten, konnten die Petrischalen erschütterungsfrei transportiert werden.

2) Entnahme der Präparate: Zum Fixieren der Präparate zu den Versuchsterminen wurden die Petrischalen vorsichtig aus der Brutkammer beziehungsweise dem Kühlschrank heraustransportiert. Sodann wurden mit steriler Kanüle und Pinzette jeweils ein Deckglas entnommen, in PBS gewaschen und fixiert. Sofort danach wurden die Petrischalen wieder in den Kühlschrank oder in die Brutkammer zurücktransportiert. Hierbei waren die Kulturen etwa für zwei bis drei Minuten der Zimmertemperatur ausgesetzt.

VII Auswertung der Präparate:

1) Zählen der Mitosen: Die Mitosen wurden mit einem Leitz-Zählokular ausgezählt.

Innerhalb der 18 Quadrate (Kantenlänge = 25 μ) wurden die Mitosestadien sowie die Zellen oder Kerne so gezählt, daß diejenigen Kerne, die die obere oder linke Kante eines Quadrates berührten, als innerhalb des Quadrates liegend betrachtet wurden. Diejenigen Kerne, die die rechte oder untere Kante berührten, wurden als außerhalb liegend aufgefaßt und nicht mitgezählt. Pro Präparat wurden in 10 Gesichtsfeldern die gesamten Zellen (Kerne) gezählt und die erhaltenen Werte auf 40 beziehungsweise 20 Gesichtsfelder durch Multiplikation mit 4 oder 2 bezogen. Diese Werte wurden mit denen der Mitosen verglichen, die in 40 beziehungsweise 20 Gesichtsfeldern ausgezählt worden waren. In vier über das Präparat verteilten Sektoren wurden jeweils zusammenhängende Gesichtsfelder ausgewertet. Die Resultate wurden als Mitosen pro 1 000 Zellen (Kerne) graphisch dargestellt.

2) Beurteilung der einzelnen Phasen (FITZ-NIGGLI):

P r o p h a s e : Die Chromosomen werden als dün-

ne, verdrehte Fäden sichtbar, die ein Knäuel bilden. Die Nucleoli verschwinden. Im Verlaufe der Prophase verkürzen sich die Chromosomen und werden dicker. Zu Beginn der nächsten Phase sind sie maximal zusammengezogen.

M e t a p h a s e : Die Chromosomen ordnen sich in einer Ebene, der Metaphasenplatte, an. Sie sind dick und gut färbbar.

A n a p h a s e : Nach Teilung der Zentromeren wandert je eine Chromosomenhälfte längs der Spindelfasern zu einem Pol hin.

T e l o p h a s e : Die Chromosomen haben die Pole erreicht, es sind zwei neue Zellen mit je einem Zellkern entstanden.

In der Interphase haben sich zwei Ruhekerne gebildet, in denen die Chromosomen lediglich in Form von Chromatinbrocken sichtbar sind.

3) Schädigung der Mitosen: Mit Ausnahme des Versuchs

Nr. 5 wurden in allen Versuchen nur die morphologisch intakt erscheinenden Mitosen beurteilt. Während der **P r o p h a s e** war eine Schädigung der Mitose durch Chromatinverklumpung und verringerte Anfärbbarkeit gekennzeichnet.

Bei den Metaphasen war die Beurteilung erschwert. Als Zeichen der Schädigung galten starke Chromosomenaberration und Verklumpung. Es zeigte sich, daß nach Beendigung der Temperaturbehandlung die Veränderungen zum Teil reversibel waren.

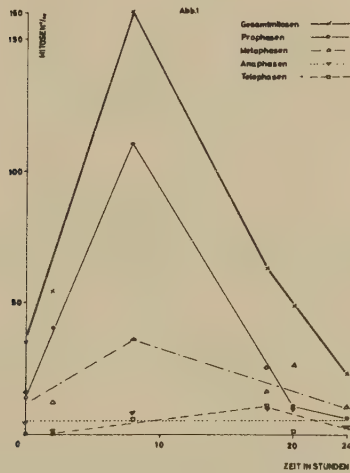
Die Anaphasen zeigten Schäden in Form starker Verklumpung, die **T e l o p h a s e n** wiesen sowohl Verklumpung als auch unterschiedliche Anfärbbarkeit auf.

E R G E B N I S S E

Versuch Nr. 1: Verhalten der Mitosen nach zweistündiger Kälteeinwirkung auf ausgewachsene Gewebekulturen.

M e t h o d e : HeLa-Zellen wurden in Petrischalen mit

je drei Deckgläschen 24 Stunden bei 37°C in einem Begaungsbehälter angezüchtet. Die zu einer gleichmäßigen Zelllage ausgewachsenen Kulturen wurden für zwei Stunden einer Temperatur von 4°C ausgesetzt und anschließend bei 37°C weiterinkubiert. Sofort nach dem Kälteschock, weiterhin nach 2, 8, 18, 20 und 24 Stunden wurde je ein Deckgläschen entnommen, fixiert und mit H-E gefärbt. Es wurden je Präparat die Mitosen pro 2 000 Zellen ausgezählt und auf 1 000 Zellen bezogen.



Das Ergebnis (Abb. 1) zeigt nach Beendigung der Kälteeinwirkung einen sofort einsetzenden Mitoseanstieg mit einem Maximum nach 8 Stunden.

Versuch Nr. 2: Verhalten der Mitosen nach zweistündiger Kälteeinwirkung auf Gewebekulturzellen in Suspension.

Methode: HeLa-Zellen wurden nach einer Trypsinpassage in 15 ml vorgekühltem Nährmedium von 4°C resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend für zwei Stunden einer Temperatur von 4°C ausgesetzt. Dann wurden die Zellen in eine Petrischale mit 10 Deckgläschen

eingesät und bei 37°C in der Begasungsanlage angezüchtet. Das Beschicken der Petrischalen wurde in der Brutkammer durchgeführt, um die frisch eingesäten und lose sedimentierten Zellen keinen Erschütterungen durch Transport auszusetzen, was zu einer ungleichmäßigen Zellbesiedlung der Deckgläser geführt hätte. Nach 1, 1 1/2, 3, 7, 8, 18, 20, 22, 23 und 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurde je ein Präparat fixiert und eine H-E-Färbung durchgeführt.

E r g e b n i s : Nach 1, 1 1/2 und 3 Stunden war eine Beurteilung noch nicht möglich, da die Zellen noch nicht ausgebreitet waren. Erst nach sieben Stunden hatte sich ein Teil der Zellen ausgebreitet und haftete den Deckgläsern an. Nach 18 Stunden zeigten fast alle HeLa-Zellen gutes Wachstum. Durch Zählung von 10 Gesichtsfeldern wurde wieder die Gesamtzellzahl bestimmt. In 20 Gesichtsfeldern pro Präparat wurden die Mitosen ausgezählt, wobei darauf geachtet wurde, daß die Zelldichte der ausgezählten Felder möglichst gleichmäßig war.

Die erhaltenen Werte zeigten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer einen stetigen Mitoseanstieg. Da die Zelldichte der Präparate nicht gleichmäßig genug war, wurde der Versuch wiederholt.

Versuch Nr. 3: Besteht aus zwei Parallelversuchen A und B:

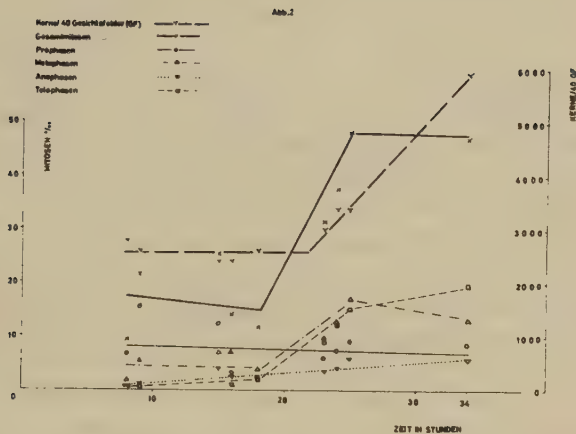
A: Wiederholung von Versuch Nr. 2:

M e t h o d e : Die Versuchsanordnung entspricht derjenigen des Versuchs Nr. 2. Die Fixierung von Präparaten wurde hier 8, 9, 15, 16, 18, 23, 24, 25 und 34 Stunden nach Beendigung der Kälteeinwirkung, und anstelle der H-E-Färbung eine Feulgenfärbung durchgeführt. Zur Zählung der Mitosen wurden 40 Gesichtsfelder pro Präparat ausgezählt. In 10 Gesichtsfeldern wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und zum Vergleich mit den Mitosen mit 4 multipliziert.

Das **E r g e b n i s** (Abb. 2) zeigt einen Anstieg der Gesamtmitoserate zwischen der 18. und 25. Stunde nach dem Kälteschock von etwa 15%o auf 45%o.

Von einem eindeutigen Prophasenanstieg kann auf Grund der Versuchsergebnisse nicht gesprochen werden.

Die Metaphasen zeigen von der 18. Stunde an eine Zunahme, ausgehend von einer Metaphaserate von 3%o



bis zu einem Maximum bei 25 Stunden nach dem Kälteschock von etwa 18%.

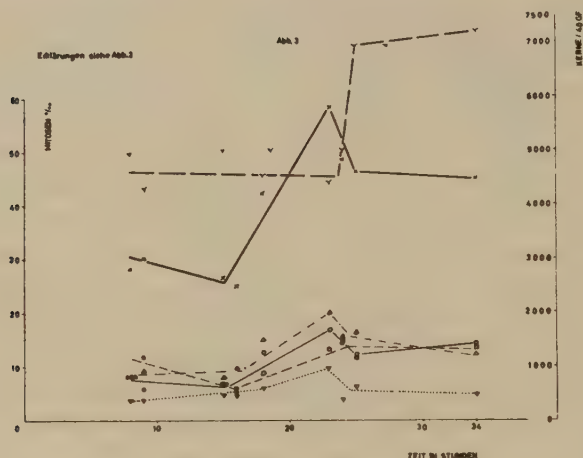
Von einem Anaphasenanstieg kann auf Grund der Ergebnisse nicht mit Sicherheit gesprochen werden.

Deutlich ist ein Anstieg der Telophasen-rate zwischen der 18. und 34. Stunde nach dem Kälteschock, der von 3% ausgeht und nach 34 Stunden mit 20% ein Maximum erreicht. Möglicherweise wurde der Gipfel - zwischen der 25. Stunde nach Beendigung der Kältebehandlung (15%) und der 34. Stunde (20%) - nicht erfaßt.

B: Verhalten der Mitosen nach Ersatz des Nährmediums durch PBS und anschließender Kälteeinwirkung.

M e t h o d e : Trypsinierte HeLa-Zellen wurden in eine Petrischale mit 10 Deckgläschen eingesät und für 33 Stunden einer Temperatur von 37°C im Begasungsbehälter ausgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Kulturen gleichmäßig ausgewachsen. Anschließend wurde für 24 Stunden das Nährmedium gegen phosphatgepufferte Salzlösung ersetzt und die Kultur bei Zimmertemperatur (20°C) gehalten. Danach folgte für zwei Stunden eine Kältebehandlung bei 4°C, nachdem die PBS wieder gegen Nährmedium ausgetauscht worden war. Nach 8, 9, 15, 16, 18, 23, 24, 25 und 34 Stunden Inkubation bei 37°C in der Begasungsan-

lage wurden Präparate entnommen und nach Feulgen gefärbt.



E r g e b n i s (Abb. 3): Zwischen der 16. und der 23. Stunde nach Beendigung der Temperaturbehandlung bei 4°C zeigt sich ein Anstieg der Gesamtmitosen von 25% auf 58%. 25 und 34 Stunden nach der Kältebehandlung findet sich ein Wert von etwa 45%.

Von der 16. Stunde nach Beendigung der Kältebehandlung an ist ein Prophasenanstieg zu beobachten, der sein Maximum 23 Stunden nach dem Kälteschock erreicht. Die Prophasenrate steigt von 8% auf 17% an, 25 Stunden nach dem Schock sind die Prophasen auf 12% gefallen.

Gleichzeitig mit dem Prophasenanstieg verläuft ein Metaphasanstieg. Ausgehend von 9% steigen die Metaphasen 16 Stunden nach Beendigung des Kälteschocks an und erreichen 23 Stunden nach der Kältebehandlung einen Gipfel von 19%.

Der Anaphasanstieg ist zwischen 8 und 18 Stunden nach dem Kälteschock gering. Die Anaphasen zeigen Werte um 5%. 23 Stunden nach der Kältebehandlung wird ein Gipfel von 10% erreicht. Darauf folgt ein Abfall auf Werte um 5%.

Die Telophasenrate steigt 9 Stunden nach

Beendigung der Kältebehandlung, ausgehend von 8% bei 8 Stunden nach dem Schock, auf 12%. 16 Stunden nach dem Kälteschock sind die Telophasen auf 6% abgefallen. Nach weiteren 8 Stunden wird ein zweiter Gipfel von 15% erreicht.

Ein Vergleich der Auszählungsergebnisse der Gesamtzellzahlen zeigt in beiden Versuchen (3A und 3B) einen Anstieg, der dem vorhergehenden Mitoseanstieg folgt. Dieser Anstieg ist besonders in Versuch Nr. 3B deutlich: Zwischen der 24. und der 25. Stunde nach dem Kälteschock steigt die Zellzahl von etwa 4600 auf 7000 pro 40 Gesichtsfelder. In Versuch Nr. 3A ist ebenfalls zwischen der 25. und der 34. Stunde nach dem Kälteschock die Zellzahl von 3400 auf etwa 5900 Zellen pro 40 Gesichtsfelder angestiegen.

Versuch Nr. 4: Verhalten der Mitosen bei alternierender Kälte-Wärme-Behandlung.

M e t h o d e : HeLa-Zellen wurden nach der Einsaat in zwei Petrischalen mit je 9 Deckgläschen für 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Begasungsgefäß inkubiert. Danach waren die Kulturen gleichmäßig ausgewachsen. Anschließend folgte für vier Stunden eine Behandlung bei einer Temperatur von 4°C, Danach wurde eine siebenmalige alternierende Wärme-Kälte-Behandlung durchgeführt, indem die Kulturen für jeweils 30 Minuten bei 37°C und 4°C gehalten wurden. Während der Wärme-Kälte-Behandlung wurden nach der ersten, zweiten und sechsten Inkubation bei 37°C sowie nach der letzten Kälteperiode je ein Präparat fixiert (K1 - K4). Nach Beendigung der alternierenden Temperaturbehandlung wurden die Kulturen bei 37°C weiterinkubiert und nach 8, 9, 15, 16, 18, 21, 23, 24, 34 1/4, 35, 36 und 38 Stunden jeweils Präparate entnommen. Die Präparate wurden wie in Versuch Nr. 3 nach Feulgen gefärbt.

E r g e b n i s s (Abb. 4): Nach vierstündiger Kältebehandlung mit anschließender halbstündiger Inkubation bei 37°C (K1) liegt die Gesamtmitoserate bei 42 %. Dieser Wert wird hauptsächlich durch die Metaphasen (16%) und die Telophasen (15%) bestimmt. Die Prophasenrate liegt bei 6%, die Anaphasenrate beträgt 4%.

Während des alternierenden Schocks sind

folgende Veränderungen festzustellen: 1 1/2 Stunden nach Beginn der alternierenden Temperaturbehandlung (nach der zweiten Inkubation, K2) steigt die Metaphasenrate auf einen Gipfel von 23%, die Telophasenrate auf einen Gipfel von 17%. Anschließend fallen die Meta- und Telophasen auf Null ab (K3 - K4). Die Pro- und Anaphasenraten fallen gleich ab, sodaß nach der sechsten Inkubation - im Anschluß an die fünfte Kälteperiode - keine Mitosen in diesem Stadium mehr gefunden werden konnten. Einhergehend mit einer zunehmenden Zerstörung gehen die Mitosen am Ende des siebenstündigen alternierenden Temperaturschocks auf Null.

Während der im Anschluß an die Kälte-Wärme-Behandlung durchgeführten Inkubation bei 37°C verhalten sich die Mitosen folgendermaßen: 8 Stunden nach Beendigung des Kälteschocks haben die Gesamtmitosen mit 70% einen Gipfel erreicht und sinken 21 Stunden nach der Kältebehandlung auf ein Minimum von etwa 24% ab. Nach 35 Stunden beginnt ein erneuter Anstieg.

Die Prophasen haben 8 Stunden nach Beendigung der alternierenden Temperaturbehandlung ein Maximum von 23 % erreicht und sinken nach weiteren 10 Stunden auf 9% ab. 35 Stunden nach Beendigung des Kälteschocks erfolgt wieder ein Anstieg.

Zeitlich verhalten sich die Metaphasen analog, die Werte liegen jedoch höher: Von 35% 8 Stunden nach dem Schock fallen die Metaphasen auf 9% 21 Stunden nach der Temperaturbehandlung ab. Auch hier folgt 35 Stunden nach Beendigung des Kälteschocks ein Anstieg.

Von einem Anaphasenanstieg kann auf Grund der Versuchsergebnisse nicht gesprochen werden.

Die Telophasen fallen 8 Stunden nach dem Kälteschock, ausgehend von 12%, stetig auf 4% zur 24. Stunde ab und erreichen einen zweiten Gipfel von 16% 34 1/4 Stunden nach dem Kälteschock.

Das Ergebnis von Versuch Nr. 4 zeigt, daß der Gipfel des Mitoseanstiegs möglicherweise innerhalb der ersten 8 Stunden nach Beendigung der alternierenden Kälte-Wärme-Behandlung liegt und in diesem Versuch

MITOTEN %

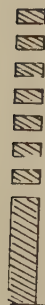
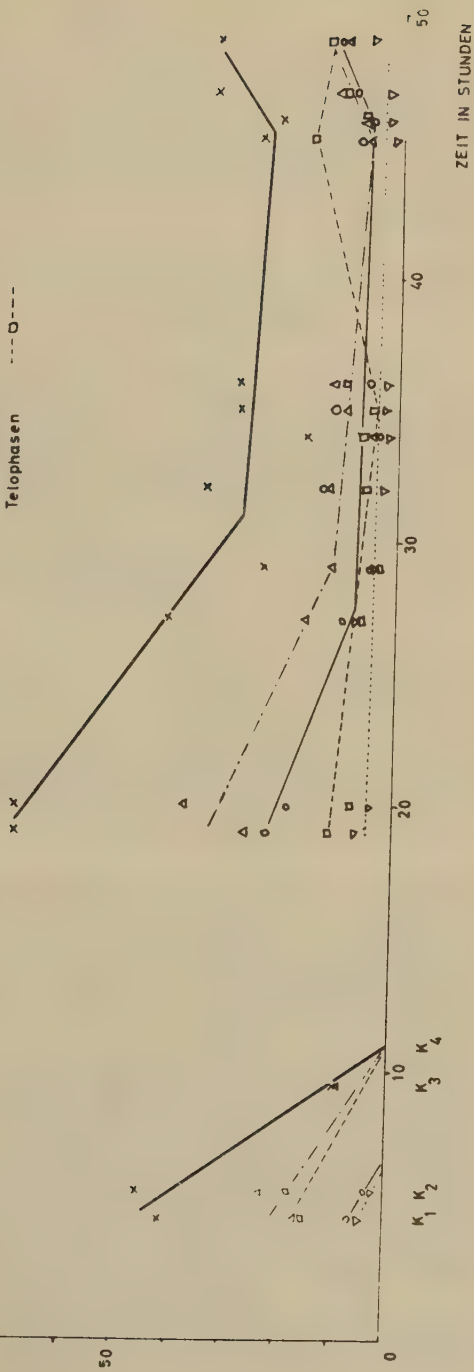


Abb. 4

- Gesamitosen — x —
- Prophasen — o —
- Metaphasen — Δ —
- Anaphasen — ▽ —
- Telophasen — □ —



nur deshalb nicht erfaßt wurde, weil während des genannten Zeitraumes keine Präparate zur Untersuchung gelangt sind. Die weiteren Untersuchungen befassen sich daher mit dem Zeitraum unmittelbar nach Beendigung der Temperaturbehandlung.

Versuch Nr. 5: Verhalten der Mitosen unmittelbar nach dem Kälteschock.

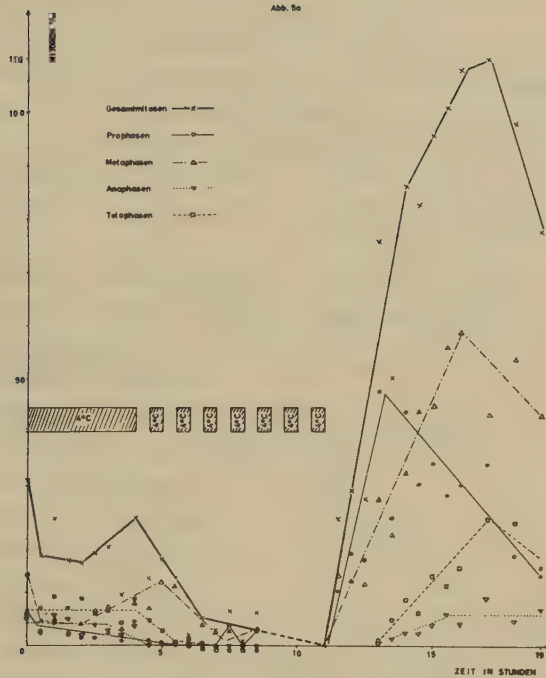
M e t h o d e : Die Versuchsanordnung entspricht dem Versuch Nr. 4. Während des vierstündigen Kälteschocks von 4°C , der anschließenden alternierenden Wärme-Kälte-Behandlung und der darauffolgenden Inkubation bei 37°C wurden halbstündlich Präparate fixiert und nach Feulgen gefärbt. Je Präparat wurden wiederum 10 Gesichtsfelder zur Bestimmung der Gesamtzellzahl gezählt, und in 20 Gesichtsfeldern wurden die Mitosen ausgezählt.

E r g e b n i s : I Verhalten der Mitosen während des Kälteschocks.

Da während der Kältebehandlung morphologisch erfaßbare Schädigungen an einem Teil der mitotischen Kerne auftreten, wurden die intakt erscheinenden und die geschädigten Mitosen in diesem Versuch getrennt bestimmt und die erhaltenen Werte miteinander verglichen.

a) Intakt erscheinende Mitosen (Abb. 5a): Während der vierstündigen kontinuierlichen Kältebehandlung sinken die Gesamtmitosen von einem Ausgangswert von 31% vor dem Schock auf 17% nach der ersten halben Stunde ab, nach zwei Stunden wird ein Minimum von 15% erreicht. Danach steigt die Gesamtmitoserate wieder an und erreicht zum Ende des kontinuierlichen Kälteschocks einen Wert von 23%. Dieser zweite Anstieg resultiert aus dem Anstieg der Meta- und Telophasenraten. Zweieinhalb Stunden nach Beginn der alternierenden Wärme-Kälte-Behandlung folgt ein steiler Abfall der Gesamtmitoserate auf 5% (nach der dritten Inkubation bei 37°C). Innerhalb der weiteren Temperaturbehandlung sinken die Gesamtmitosen praktisch auf Null ab.

Die Prophasen fallen innerhalb von fünfeinhalb Stunden nach Versuchsbeginn (nach der zweiten Inkubation bei 37°C) von einem Ausgangswert von 7% vor dem



Schock annähernd stetig auf Null. Während der vierten und fünften 37°C -Periode der alternierenden Wärme-Kälte-Behandlung kommt es vorübergehend zum Auftreten von Prophasenschüben.

Die Metaphasen sinken von einer Mitoserate von 14% vor Versuchsbeginn innerhalb der ersten halben Stunde der kontinuierlichen Kältebehandlung auf 4% ab. Nach weiteren eineinhalb Stunden findet sich wieder ein Anstieg, der nach der ersten Kälteperiode der alternierenden Wärme-Kälte-Behandlung ein Maximum von 12% erreicht. Danach folgt bis zum Beginn der dritten Kälteperiode ein steiler Abfall auf 3%. Zum Ende der alternierenden Temperaturbehandlung wird der Nullwert erreicht.

Die Anaphasenrate fällt von 5% vor Versuchsbeginn auf 2% nach 30 Minuten Kühlung ab. Nach weiteren 30 Minuten steigen die Anaphasen auf 6%. Danach folgt innerhalb von 3 1/2 Stunden ein Abfall auf Null.

Die Telophasenrate hält sich in den ersten vier Stunden nach Versuchsbeginn um einen Wert von 7%. Während der folgenden eineinhalb Stunden alternierender Wärme-Kälte-Behandlung sinken die Telophasen auf 1% und erreichen nach weiteren zwei Stunden praktisch den Wert Null.

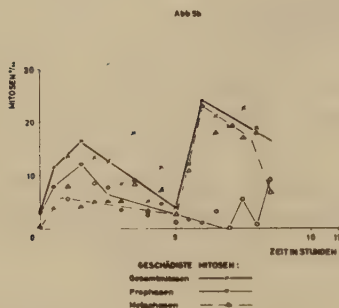
b) Geschädigt erscheinende Mitosen (Abb. 5b): Nur diejenigen Mitosen, die trotz schwerer Schädigung noch einwandfrei einer Phase zugeordnet werden konnten, wurden erfaßt.

Die Gesamtschädigungsrate umfaßt die geschädigten Pro- und Metaphasen. Aus der geringen Zahl der geschädigten Ana- und Telophasen konnten keine verwertbaren Ergebnisse abgeleitet werden.

Die Gesamtschädigungsrate steigt - korrespondierend zum Abfall der Mitoserate - von 4% vor Versuchsbeginn auf ein Maximum von 16%

nach einer Kühldauer von eineinhalb Stunden an. Während der nächsten 3 1/2 Stunden (Ende der ersten Kälteperiode der alternierenden Temperaturbehandlung) fällt die Zahl der geschädigten Mitosen auf ein Minimum von 4% ab. Danach folgt innerhalb einer Stunde (Ende der zweiten 4°C-Periode) ein steiler Anstieg auf einen zweiten Gipfel von 24%. Nach weiteren zweieinhalb Stunden (5. Kälteperiode) sind die geschädigten Mitosen auf 16% abgefallen. Danach ließ sich wegen der zunehmenden Schädigung der Mitosen ein Ergebnis nicht mehr erheben.

Der erste Gipfel wird hauptsächlich



durch die Zunahme der geschädigten Prophasen verursacht. Diese steigen von 3% vor Versuchsbeginn innerhalb der ersten eineinhalb Stunden bei einer Temperatur von 4°C auf 12%. Während der folgenden eineinhalb Stunden folgt ein Abfall auf 3%, im Laufe der nächsten vier Stunden sinkt die Rate der geschädigten Prophasen auf Null ab (nach der dritten 4°C-Periode).

Der zweite Gipfel wird weitgehend durch die geschädigten Metaphasen hervorgerufen. Von Null vor Versuchsbeginn steigen diese während der nächsten Stunde auf 7% an. In den folgenden vier Stunden erfolgt ein Abfall auf 3%. Danach (nach der ersten Kälteperiode der alternierenden Temperaturbehandlung) findet sich ein steiler Anstieg auf 23%. Nach weiteren zweieinhalb Stunden sind die geschädigten Metaphasen auf 7% abgefallen.

II Verhalten der Mitosen nach Beendigung des Kälteschocks (Abb. 5a).

Während der achtstündigen Inkubation bei 37°C nach Beendigung der alternierenden Temperaturbehandlung setzt ein steiler Gesamtmitoseanstieg ein, der mit 108% fünf Stunden nach Reinkubation bei 37°C mehr als das Dreifache der Gesamtmitoserate vor Versuchsbeginn (31%) erreicht.

Die Prophasenrate steigt innerhalb von zwei Stunden auf maximal 47%, das ist etwa das siebenfache des Wertes vor Versuchsbeginn (7%).

Die Metaphasen erreichen fünf Stunden nach Beendigung der Kältebehandlung 59%. Dieser Wert entspricht dem Vierfachen der Metaphasenrate vor Versuchsbeginn.

Nachdem das Maximum erreicht worden ist, folgt jeweils ein steiler Abfall der Mitoseraten: Die Prophasen sind acht Stunden nach Beginn der Reinkubation bei 37°C auf 13% abgefallen, die Metaphasen auf 43%.

Die während der alternierenden Temperaturbehandlung auf Null abgefallenen Werte der Ana- und Telophasen beginnen zwei Stunden nach Reinkubation bei 37°C wieder anzusteigen. Die Anaphasen erreichen nach weiteren zweieinhalb Stunden bei stetigem Anstieg ein

Maximum von 9%, die Telophasen nach vier Stunden 24%.

Versuch Nr. 6: Verhalten der Mitosen bei ausschließlich alternierender Temperatureinwirkung.

M e t h o d e : HeLa-Zellen wurden nach Einsaat in 10 Petrischalen mit je drei Deckgläschen 43 Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Begasungsgefäß angezüchtet. Danach waren die Kulturen zu gleichmäßigen Zellagen ausgewachsen. Anschließend wurde eine alternierende Temperaturbehandlung durchgeführt, indem die Kulturen für je 30 Minuten bei 4°C und 37°C, anschließend wieder bei 4°C gehalten wurden. Danach wurden die Petrischalen in zwei Gruppen geteilt: Gruppe A wurde sofort bei 37°C inkubiert, Gruppe B wurde für weitere 30 Minuten 4°C ausgesetzt und anschließend bei 37°C inkubiert. Während des Schocks und der nachfolgenden sieben- bis achtstündigen Reinkubation bei 37°C wurden halbstündlich Präparate entnommen und nach Feulgen gefärbt. Die Auswertung erfolgte wie in Versuch Nr. 3.

E r g e b n i s : Ausgehend von einer Gesamtmitoserate von 21% vor Versuchsbeginn zeigte sich nach der zweiten Kühlperiode ein Abfall auf ein Minimum von 6%. In der folgenden Wärmeperiode stiegen die Gesamtmitosen auf 11% an. Dieser Anstieg wird durch die Zunahme der Metaphasen bedingt.

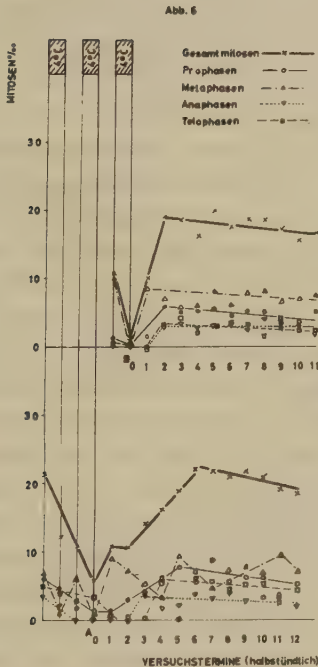
Während der gemeinsamen Schockbehandlung der beiden Gruppen A und B gehen lediglich die Anaphasen nach einer halbstündigen Kühlung mit anschließender halbstündiger Wärmeperiode von 3% auf Null.

Die Prophasen sinken von 6% vor Versuchsbeginn auf 1% am Ende der zweiten Wärmeperiode ab.

Die Metaphasen fallen von 7% vor der Temperaturbehandlung auf 1% nach der ersten Kühlperiode ab. In der folgenden Wärmeperiode steigen die Metaphasen wieder auf 6%, fallen nach der nächsten Kühlung auf 1% und steigen am Ende der zweiten Wärmeperiode auf 9% an. Die Metaphasen erweisen sich auch hier als widerstandsfähig gegen die Kältebehandlung: Nach Ablauf der Wärmeperioden erscheinen sie wieder normal.

Die Telophasenrate sinkt von 5% vor der Kälte-Wärme-Behandlung auf 3% am Ende der zweiten Kühlperiode ab.

Gruppe A: Umfaßt die Gruppe von Petrischalen der im Anschluß an die zweite Kühlperiode bei 37°C inkubierten Zellen.



Während der weiteren Inkubation im Anschluß an die Aufteilung der Versuchsgruppen (nach halbstündiger Inkubation bei 37°C im Anschluß an die zweite Kälteperiode) steigt die Zahl der Gesamtmitosen innerhalb von zwei Stunden weiter an und erreicht ein Maximum von 22%.

Die Prophasen steigen innerhalb von zwei Stunden auf einen Wert von etwa 8% an und sinken in den folgenden 3 1/2 Stunden stetig auf 5% ab.

Die Metaphasen fallen von 9% nach halbstündiger Inkubation bei 37°C innerhalb der folgenden eineinhalb Stunden auf 3% ab. In der näch-

sten halben Stunde folgt ein Anstieg auf 9%, danach fallen die Metaphasen wieder auf 4% und zeigen im Anschluß daran innerhalb von zwei Stunden einen erneuten Anstieg auf 9%.

30 Minuten nach Aufteilung der Versuchsgruppen sind keine Anaphasen nachweisbar. Nach einer weiteren halben Stunde beträgt die Anaphasenrate 4%, danach wurden Werte um 3% gefunden.

Die Telophasen erreichen eineinhalb Stunden nach der Aufteilung ein Maximum von 6% und sinken innerhalb der anschließenden vier Stunden auf 4% ab.

Gruppe B: Umfaßt die Gruppe von Zellen, die einer dritten halbstündigen Kühlperiode ausgesetzt wurden. Während der dritten Kühlperiode bei 4°C sinken die Gesamtmitosen von 11% auf 1% ab. Innerhalb einer einstündigen Reinkubation bei 37°C erfolgt ein Anstieg auf 19%. Während der nächsten 4 1/2 Stunden finden sich Werte um 17%.

Die Prophasen fallen nach der dritten Kühlperiode auf 0,3% ab, steigen dann innerhalb einer Stunde bei 37°C auf 6% und sinken in den nächsten 4 1/2 Stunden auf etwa 4% ab.

Die Metaphasen erreichen nach der dritten Kühlung 0,4%. Innerhalb von 30 Minuten bei 37°C steigt die Metaphasenrate auf 8% an und sinkt während der folgenden fünf Stunden auf etwa 6% ab.

Die Anaphasen sind eine halbe Stunde nach der letzten Kühlperiode noch nicht nachweisbar. Eine weitere halbe Stunde später beträgt die Anaphasenrate 3% und hält sich dann um Werte von 3%.

Die Telophasenrate beträgt nach dem letzten Kälteschock 0,3% und fällt in der ersten halben Stunde bei 37°C auf Null ab. Während der folgenden Stunde findet sich ein Anstieg auf 4%. In den nächsten drei Stunden liegen die Werte um 2 bis 4%. Danach fallen die Telophasen erneut ab.

Versuch Nr. 7: Verhalten der Mitosen bei alternierender Temperaturbehandlung von verschiedener Dauer.

Versuch Nr. 6 hat ergeben, daß bei nur zwei- bis dreimaligem Wechsel zwischen Inkubation bei 37°C und Kühlung bei 4°C die Gesamtmitoserate nach der alternierenden Temperaturbehandlung nicht das Niveau erreicht, das vor der Kältebehandlung vorhanden war. Daher wurden nach dem Vorbild von Versuch Nr. 6 nach halbstündigen Kälteperioden von 4°C , die mit halbstündigen Inkubationen bei 37°C abwechselten, Gruppen von Gewebekulturen einer zweieinhalb-

stündigen Inkubation bei 37°C ausgesetzt: Siehe Abb. 7a.

M e t h o d e : HeLa-Zellen wurden 24 Stunden nach der Passage und Einsaat in 23 Petrischalen mit je drei Deckgläschen einer alternierenden Kälte-Wärme-Behandlung ausgesetzt. Sämtliche Petrischalen wurden zunächst einer halbstündigen Kühlung bei 4°C, anschließend einer halbstündigen Inkubation bei 37°C und danach wieder für 30 Minuten einer Kühlung bei 4°C ausgesetzt. Im Anschluß daran, sowie nach jeder weiteren Kühlung wurde eine Gruppe von Kulturen für zweieinhalb Stunden bei 37°C inkubiert. Halbstündlich wurden Präparate entnommen und nach Feulgen gefärbt.

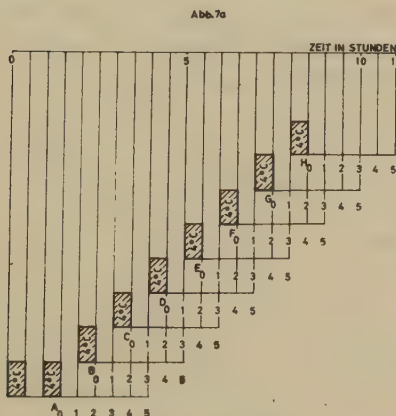
E r g e b n i s s :

Gruppe A: Nach zweimaligem Kälteschock steigen die Gesamtmitosen in eineinhalb Stunden nur wenig über die Mitoserate vor der Kältebehandlung an: Von 23% auf 27%.

Die Prophasen sinken nach der zweiten Kühlung innerhalb von einer halben Stunde auf 0,3% ab. In der nächsten Stunde wird ein Maximum von 8% im Vergleich zu 5% vor Versuchsbeginn erreicht.

Die Metaphasen steigen während einer Stunde nach Beginn der Reinkubation bei 37°C auf 14%, sinken nach einer weiteren halben Stunde auf 6% und steigen in der nächsten halben Stunde auf 9% an. Der Wert vor Versuchsbeginn betrug 8%.

Eine halbe Stunde nach Beendigung der Temperaturbehandlung sind noch keine Anaphasen zu finden.



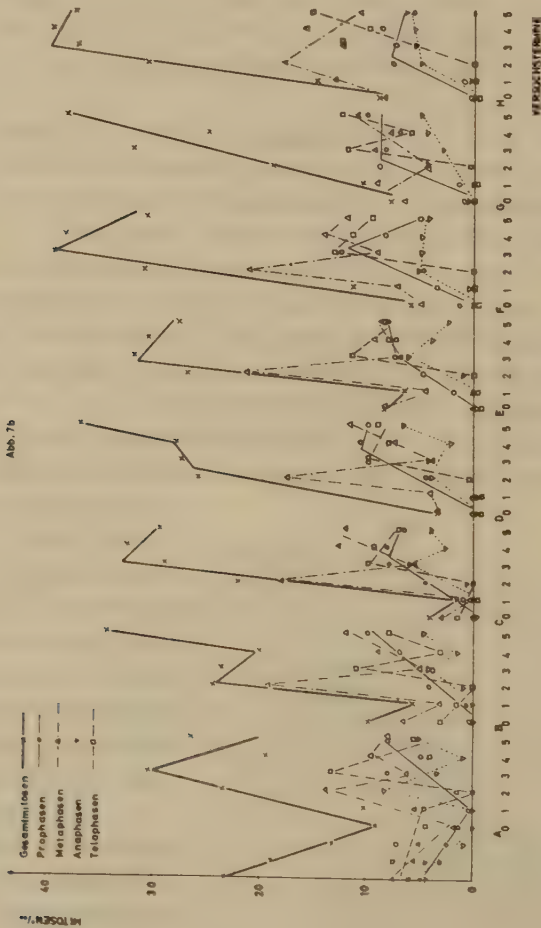
VERSUCH 7: VERSUCHSSCHEMA

Innerhalb einer weiteren halben Stunde findet sich ein Anstieg auf 8% im Vergleich zu 4% vor dem Schock. Während der folgenden Stunde fällt die Anaphasenrate auf 1% und steigt in 30 Minuten wieder auf 5% an.

Die Telophasen sinken eine Stunde nach Beendigung der alternierenden Temperaturbehandlung auf Null ab, in den

folgenden 30 Minuten zeigt sich ein Anstieg auf 13% im Vergleich zu 6% vor der Kältebehandlung. Innerhalb der nächsten Stunde wurden Werte um 5% gefunden.

Gruppe B bis H: In den nachfolgenden Gruppen, die einer häufigeren alternierenden Temperaturbehandlung ausgesetzt wurden, übersteigen die Gesamtmitosen nach Reinkubation bei 37°C nicht Werte von 40%. Diesem Maximalwert nähert sich die Gesamtmitoserate bereits nach der siebenten Kälteperiode. Das Maximum wird fast durchweg nach eineinhalb bis zwei Stunden nach Be-



endigung des Kälteschocks erreicht. Die Gesamtmitoserate liegt nach dem neunten Kälteschock etwa um ein Drittel höher als nach der zweiten Kühlung.

Die Prophasen erreichen innerhalb von eineinhalb bis zweieinhalb Stunden Maximalwerte, die 13% nach sieben Kälteschocks nicht überschreiten und durchschnittlich bei 10% liegen.

Die Metaphasenrate erreicht ein Maximum nach sechs Kälteperioden: 22%. Sonst liegen die Maximalwerte in den Gruppen B bis F bei 19%. Die Metaphasenkurven zeigen zwei Maxima. In den Gruppen B bis F ist dies besonders deutlich. Die Metaphasenrate fällt zunächst nach Beendigung der letzten Kälteperiode leicht ab (Gruppen B, C, E) oder steigt nur unbedeutend an (Gruppen D, F), um eine Stunde nach Beendigung der Kältebehandlung einen steilen Anstieg zu zeigen, der von einem steilen Abstieg innerhalb der nächsten halben Stunde gefolgt ist. Während der folgenden Stunde kommt es zu einem zweiten Anstieg, der jedoch nicht die Höhe oder Steilheit des ersten erreicht. Nach der achten und neunten Kühlperiode (Gruppen G und H) erscheint der erste Gipfel nicht mehr so ausgeprägt, was darauf zurückgeführt werden könnte, daß die Metaphasen in zunehmendem Maße zerstört werden.

Die Anaphasen zeigen, wie bereits in Gruppe A beschrieben, auch in den Gruppen B, C, D und G mehr oder weniger deutlich eine Doppelgipfligkeit. Die Gruppen E, F und H zeigen nur einen Gipfel.

Die Telophasen zeigen in den Gruppen B, G und H zwei, in den Gruppen A, C, D und F nur einen Gipfel.

D I S K U S S I O N

Der Einfluß verschiedener physiko-chemischer Einwirkungen auf den Mechanismus der Mitosehemmung konnte an verschiedenen Untersuchungsobjekten studiert werden. Nach SWANN (1954 und 1957) scheinen Bau- und Betriebsstoffwechsel gegenüber der Zellteilung den Vorrang in der Energieversorgung zu haben. Die Interphase wird als physiko-chemische Vorbereitung für die Mitose aufgefaßt. In dieser Periode wird Energie gespeichert, die sich in der Mitose entläßt. Dabei unterliegen Zellen periodischen Veränderungen, in denen sie von Zeit zu Zeit eine Phase größerer Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen durchlaufen (HOTCHKISS 1954). Durch Anaerobiose, respiratorische Hemmung oder ungünstige Ernährungsbedingungen wird die Teilungspotenz mehr betroffen als das Wachstum (SWANN 1954). Wird die Synthese einer Stoffwechselkomponente gehemmt und erfolgt hierdurch eine Fixierung der Zelle in einer bestimmten Mitosephase, so kann nach Aufhebung dieser experimentellen Stoffwechselstörung eine Synchronisation erreicht werden (FALCONE et al. 1956). ZEUTHEN et al. (1954) stellten folgende Arbeitshypothese für das Ergebnis einer alternierenden Temperaturbehandlung in einer *Tetrahymena pyriformis* Kultur auf: Eine bestimmte Phase des Generationszyklus hat einen höheren Temperaturkoeffizienten als eine andere. Bei Senkung der Temperatur werden Zellen in dieser Phase der Entwicklung zurückbleiben und sich hier ansammeln.

Der Erfolg einer Mitosehemmung findet im Nucleinsäurehaushalt der Zellen seinen Ausdruck. Bei Entzug von DNS aus dem Nährmedium teilen sich Zellen von *Thermobacterium acidophilus* nicht, nehmen aber an Größe zu (JEENER et al. 1952, BRACHET 1955). Fehlen von Uracil hemmt sowohl Teilung als auch Wachstum. Einwirkung von N-Lost auf Bäckerhefe führt zu einer weitgehenden Hemmung der Nucleinsäuresynthese (HUTCHENS et al. 1952). Mitosehemmung durch Fehlen von Thymin im Nährmedium von *Escherichia coli* 15_T- führt innerhalb einer Generationszeit zur Verdoppelung des RNS-Gehaltes pro Zelle. Es kam jedoch weder zur Teilung noch zur DNS-Synthese. Proteine wurden weiter synthetisiert, Oxydation und Metabolisie-

rung der Glukose waren nicht behindert (COHEN et al. 1954, BARNER et al. 1956). MAALØE et al. (1954) synchronisierten *Salmonella typhimurium* durch Temperaturschocks und stellten eine besondere Empfindlichkeit der DNS-Synthese gegen Temperaturschwankungen fest: Während Verlangsamung der DNS-Synthese wurde eine Anhäufung von DNS-Vorstufen in den Kühlperioden vermutet. Bei Reinkubation unter optimalen Verhältnissen kommt es zur Kernteilung, sobald ein kritisches Niveau der DNS-Vorstufen erreicht wird. Nach Mitosehemmung durch Hitzebehandlung von *Tetrahymena pyriformis* Kulturen erfolgten sowohl eine Zunahme des Volumens als auch des DNS-Gehaltes pro Zelle (ZEUTHEN et al. 1954). Nach der Behandlung wiegt die Multiplikation die Synthese auf, Volumen und DNS-Gehalt nehmen proportional dazu ab. Kälteschocks in Kulturen von *Bazillus megatherium* hemmen sowohl die Teilung als auch die DNS-Synthese, wobei die letztere offenbar weniger empfindlich ist (DE LAMATER 1956). In ruhenden Zellen von *Escherichia coli*- und *Bazillus megatherium*-Kulturen kommt es nach Zusatz von Glukose zu synthetischen Medien zur Zunahme von Ribose und Nucleinsäurebasen. Vor der Teilung fällt der Ribosegehalt ab, während der Desoxyribosegehalt zunimmt (SCOTT et al. 1956). In durch Kälteschock synchronisierten HeLa-Zellkulturen zeigte der DNS-Gehalt pro Zelle einen Anstieg vor der Teilung, gefolgt von einem steilen Abfall synchron zum zunehmenden Mitoseindex (NEWTON et al. 1959).

Weiterhin spielen die SH-Gruppen eine wichtige Rolle bei der Zellteilung. Es zeigte sich, daß ein Schwermetallzusatz zum Nährmedium die Teilung blockiert. Nach Hinzufügen SH-Gruppen haltiger Substanzen wird diese Hemmung wieder aufgehoben (RAPKINE 1931). NICKERSON (1948) vermutete, daß bei der Teilung die Bildung innermolekularer Disulfidbrücken verhindert wird.

Diskussion der Versuchsergebnisse.

I N a c h B e e n d i g u n g d e r T e m p e -

temperaturbehandlung kam es zu einem sofortigen Anstieg der Gesamtmitoserate (siehe Abb. 1, 5a, 6 und 7b). Bei längerer Dauer der Temperaturbehandlung häuften sich während der Inkubationsperioden bei 37°C die Prophasen. Abb. 5a und 5b veranschaulichen den Anstieg der Prophasen während der vierten und fünften Inkubation. Während der nachfolgenden Kältebehandlung fallen die Prophasen auf Null ab. Der sofortige Anstieg wird durch die Zunahme der Pro- und Metaphasen bedingt. Der Anstieg der Ana- und Telophasen folgt mit einhalb- bis zweistündiger Verspätung.

Sobald ein bestimmtes kritisches Niveau der DNS-Vorstufen bei *Salmonella typhimurium* erreicht wird, tritt Kernteilung ein (MAALØE et al. 1954). Die genannten Autoren nehmen an, daß die Temperaturbehandlung die Zellteilung durch einen unbekannten Mechanismus induziert. So wurde bei Wärmebehandlung von Mikroorganismen beobachtet, daß während der Wärmeperioden die Proteinsynthese blockiert ist, um bei optimaler Temperatur dann wieder in Gang zu kommen (SCHERBAUM 1960). Kurz nach der Reinkubation von Bakterienkulturen beobachtete auch DE LAMATER (1956) Zellteilungen. Nach Kältebehandlung von *Thermobacter acidophilus* teilten sich bei Reinkubation 50% der Kerne sofort (JEENER et al. 1952). Nach mehrstündiger Kältebehandlung von embryonalen Hühner - Fibroblasten und - Myeloblasten konnte kurz nach der Reinkubation bei 37°C eine beachtliche Mitosenzunahme, insbesondere ein Anstieg der Prophasen, festgestellt werden (CHEVRE-MONT-COMHAIRE et al. 1956 und FREDERIC 1956). HOFFMANN-BERLING (1954) erwähnt einen Anstieg der Mitosen nach

mehrstündiger Kälteeinwirkung auf Hühnerembryonengewebe sofort nach Beendigung der Behandlung. Dieser Mechanismus könnte mit der Reservoirtheorie von SWANN (1957) erklärt werden unter der Voraussetzung, daß nicht alle Stoffwechselfunktionen während der Temperaturbehandlung zum Stillstand kommen. Die Anhäufung von DNS-Vorstufen in den HeLa-Zellen könnte während der Kältebehandlung vor sich gehen, wenigstens während der bei 37°C stattfindenden Inkubationsperioden zwischen den Kälteschocks. Wenn das kritische Niveau erreicht worden ist, entladen sich die Energiere-servoirs in die Mitose (SWANN 1954 und 1957), sobald die Kulturen bei optimalen Temperaturen gehalten werden.

ZEUTHEN (1958) schildert dagegen bei *Tetrahymena pyriformis* eine zeitliche Verzögerung des Ein-satzens der Mitosen ("set back") nach Beseitigung der Hemmung durch Dinitrophenol, Fluorid, Fluoroacetat und Äthylmethan sowie Azide. Der Autor nimmt an, daß diese Zeit zur Auffüllung der Speicher nach Beendigung der Hem-mung notwendig ist. Nach Reinkubation von unterkühltem Hühnerembryonalgewebe setzten die Mitosen erst nach einer Verzögerung, deren Dauer von der Tiefe der Temperatur ab-hängig war, wieder ein. SCHERBAUM et al. (1955) stellten nach einem Temperaturzyklus in *Tetrahymena pyriformis* ei-ne Verzögerungsphase von 80 Minuten bis zum Erscheinen der Mitosen fest. Bei *Bazillus megatherium* war innerhalb von 30 Minuten Reinkubation bei optimaler Temperatur nach einer Kühlung bei 15°C die Zellteilung fast völlig arre-tiert (FALCONE et al. 1956). Nach e i n stündiger Kälte-behandlung von HeLa-Zellkulturen bei 4°C folgte eine 18 bis 24 Stunden - Pause nach Reinkubation bei 37°C, ehe eine parasynchrone Teilung folgte (WILDY et al. 1958, NEWTON et al. 1959 und STOKER et al. 1959). Wahrschein-lich ist der Unterschied zwischen diesem Befund und den hier erhaltenen Versuchsergebnissen durch die unterschied-liche Dauer des Aufenthaltes in der Kälte bedingt. Be-reits nach zweistündiger Kältebehandlung (Abb. 1) ist ein sofortiger Anstieg der Mitoserate erkennbar, obwohl in diesem Versuch sehr wenig Präparate zur Auswertung ge-langt sind.

II Während der Kälteeinwirkung kommt es zu einem Stillstand von Mitosen in der Metaphase. Diese Fixierung tritt nur auf, sofern ein gewisses Stadium der Prophasenentwicklung erreicht ist beziehungsweise die Zellen noch nicht in die Anaphase eingetreten sind. Dies ist aus dem Verlauf der Mitosekurven in Abb. 5a ersichtlich. Während die Anzahl der Ana- und Telophasen sich während des Kälteschocks eine Zeit lang auf dem Niveau vor Versuchsbeginn hält und dann rasch auf Null abfällt, steigt die Metaphasenkurve annähernd synchron mit dem beschriebenen Abfall der Ana- und Telophasen an.

Subletale Temperaturzyklen hinderten *Tetrahymena pyriformis* Zellen, sich zu teilen, hielten aber bereits laufende Mitosen nicht an (SCHERBAUM et al. 1954). Bei *Bazillus megatherium* hemmen suboptimale Temperaturen selektiv und reversibel einige chemische oder physikalische Reaktionen, die mit der Trennung der Chromosomen zusammenhängen (SZYBALSKI et al. 1955, HUNTER-SZYBALSKA 1956). So kommt die Fixierung der Mitosen in der Metaphase zustande. Es wurde vermutet, daß Kälte besonders den Mechanismus, der für die Trennung der Chromosomen verantwortlich ist, hemmt (DE LAMATER 1956, ZEUTHEN 1958). Eine Verlängerung der Mitosedauer und eine Blockierung der Metaphasen durch Kälte wurde in Hühner - Myeloblasten und - Fibroblastenkulturen beschrieben (CHEVREMONT-COMHAIRE et al. 1956). *Bazillus megatherium* und *Escherichia coli* wurden durch Kühlung ebenfalls in der Pro-Meta- und Metaphase arretiert (SCOTT et al. 1956). Die Hemmung des Eintrittes in die Prophase kann durch den bereits oben be-

schriebenen Effekt der Temperatureinwirkung auf den Stoffwechsel der Zelle erklärt werden.

III Mit zunehmender Länge der Kälteeinwirkung kommt es zu stärkeren Schädigungen der Mitosen. Um diese zu erfassen, wurde in einem Versuch eine Differenzierung der geschädigten Mitosen während der Temperaturbehandlung durchgeführt (Abb. 5b). Offenbar sind die Prophasen besonders empfindlich gegen Kälteeinwirkung, da bereits eineinhalb Stunden nach Beginn der Temperaturbehandlung ein Gipfel der Prophasenschädigungskurve erreicht wird, während die viel weniger empfindlichen Metaphasen erst zwischen fünf und sechs Stunden einen Gipfel der Schädigung erreichen.

NEWTON et al. (1959) fanden dagegen nach einstündigen Kälteschocks keine Schädigung der Metaphasen, lediglich einige Prophasen zeigten Verklumpung des Chromatins.

Colchicin als "klassischer Spindelhemmer" sowie Aminopterin, Aminometoplerin und einige Sulphydrilreagentien (Chloracetophenon, Natrium Jodacetat und Natrium Selenit) beeinflussen in Hühnerembryonalgewebe den Mitoseablauf. Weiterhin findet sich in der Metaphase eine Verklumpung der Chromosomen (HUGHES 1950 und WAYMOUTH 1952). Die Mitosegifte werden in Spindelgifte (Colchicin u. a.) und radiomimetische Substanzen wie Trypaflavin unterteilt, die den Untergang der sich teilenden Zellen hervorrufen (DUSTIN, zitiert von HUGHES). Der Effekt der Kälteeinwirkung könnte also zunächst mit einem spindelhemmenden, bei weiterer Einwirkung mit einem radiomimetischen Effekt verglichen werden. Bei schneller Abkühlung

von Hühner Myeloblasten und - Fibroblasten auf 4°C wurde eine Verklumpung der Chromosomen gefunden (CHEVRE-MONT-COMHAIRE et al. 1956). Bei 16°C wurden einige Metaphasen blockiert, bei weiterer Kälteeinwirkung kam es zu Degenerationerscheinungen. Auch hier findet sich zunächst ein spindelhemmender, bei weiterer Kühlung ein radiomimetischer Effekt.

IV Die Metaphasen zeigen eine gewisse Reversibilität der Schädigung, falls die Kältebehandlung nicht zu lange dauert. Dabei muß beachtet werden, daß der morphologische Befund einer geschädigten Mitose in gewissen Grenzen eine Reaktion auf die Kühlung ausdrückt und deshalb nicht einer bleibenden Schädigung der Metaphasen gleichkommt. Dadurch kommt es in den Inkubationsperioden der alternierenden Temperaturbehandlung zu steilen Anstiegen der Metaphasenwerte: Abb. 6 und 7b. Besonders deutlich ist in Abb. 7b in den Gruppen B bis F nach drei bis sieben Kälteschocks und einstündiger Reinkubation bei 37°C eine Zunahme der Metaphasen. Bei längerer Kälteeinwirkung ist dieser Effekt nicht mehr so ausgeprägt, was darauf zurückgeführt werden könnte, daß bei weiterer Temperaturbehandlung die in der Metaphase arretierten Mitosen bleibend geschädigt werden (Abb. 7b, Gruppe G und H).

V 18 Stunden nach Beendigung der Temperaturbehandlung ist eine Zunahme der Mitosen erkennbar, die von einem Anstieg der Gesamtzellrate gefolgt ist (Abb. 2 und 3).

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von WILDY (1958), NEWTON (1959) und STOKER (1959) überein. Austausch des Nährmediums gegen phosphatgepufferte Salzlösung (Abb. 3) hatte keine Erhöhung des Synchronisationseffektes zur Folge.

VI Die Höhe des Mitoseanstieges nach Beendigung der Temperaturbehandlung ist von deren Dauer abhängig. Abb. 6 und 7b zeigen, daß bei zwei- bis dreimaliger Kühlung der Anstieg der Gesamtmitoserate nach Reinkubation bei 37°C das Niveau vor Versuchsbeginn nur geringfügig überschreitet. Danach fällt die Gesamtmitoserate nur geringfügig ab (während einer Beobachtung von drei bis viereinhalb Stunden) (Abb. 6). Nach sieben- bis neun-stündiger alternierender Temperaturbehandlung beziehungsweise nach 11 Stunden, davon vier kontinuierlich, sieben alternierend, wird dagegen das Niveau vor Versuchsbeginn fast um das Zwei- beziehungsweise um mehr als das Dreifache übertroffen (Abb. 7b: Gruppe F, G und H und Abb. 5b).

Es erscheint fraglich, ob eine alternierende Temperaturbehandlung von HeLa-Kulturen einen gleichen Synchronisationsgrad bewirkt wie er von SCHER-

BAUM und HOTCHKISS 1954 bei Mikroorganismen erzielt wurde. Lediglich die Dauer der Temperaturbehandlung scheint ausschlaggebend zu sein, wobei eine Temperaturbehandlung, die länger als die Hälfte der Generationszeit (= 18 Stunden nach NEWTON und WILDY) andauert, einen höheren Effekt bewirkt als eine kürzere Behandlung. Nach ZEUTHEN (1958) kann die Synchronisation nach folgender Formel prozentual berechnet werden:

$$S = \frac{(M_{t1} - M_{to})}{G - M_{to}} 100$$

Dabei ist

S = Grad der Synchronisation in Prozent,

M_{t1} = die Mitoserate zur Zeit t nach Be-
endigung der Temperaturbehandlung,

M_{to} = Mitoserate vor Versuchsbeginn,

G = Gesamtzellzahl.

Die Gesamtzellzahl errechnet sich aus der Anzahl der Kerne pro 40 Gesichtsfelder beziehungsweise pro 20 Gesichtsfelder. Um einen genaueren Wert zu erhalten, wurden die Gesamtzellen aus dem Durchschnitt der Werte zur Zeit t_0 und t_1 errechnet.

Nach dieser Formel errechnet sich für

Versuch Nr. 5 (Abb. 5a):

$$\frac{(288 - 103)}{3005 - 103} 100 = 6,4\%$$

(M_{t1} = 5 Stunden nach der Kältebehandlung),

Versuch Nr. 7 (Abb. 7b):

$$M_{t1} = A_3: \frac{(102 - 61)}{2998 - 61} 100 = 1,4\%$$

$$= F_3: \frac{(142 - 61)}{3108 - 61} 100 = 2,7\%$$

$$= H_4: \frac{(122 - 61)}{2844 - 61} 100 = 2,2\%.$$

Das Ergebnis zeigt den geringen Synchronisationseffekt der Temperaturbehandlung. Da nach der Kälte nur ein kleiner Prozentsatz der Gesamtzellen bei Reinkubation eine

Synchronisation der Teilungen zeigt, wurde der Begriff "Parasynchronisation" (NEWTON et al. 1959) übernommen. Ein Vergleich der Werte von Versuch 7 und Versuch 5 zeigt jedoch, daß der Synchronisationseffekt bei längerer Dauer der Temperaturbehandlung größer ist als bei kurzer Dauer und daß die kombinierte kontinuierliche und alternierende Schockbehandlung den höchsten Effekt erzielte.

VII Offensichtlich nimmt die Steilheit des Gesamtmitoseanstieges nach Beendigung der alternierenden Kältebehandlung bei längerer Einwirkung derselben ebenfalls zu, jedoch scheint nach drei Kälteperioden hier ein Grenzwert erreicht worden zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG

I HeLa-Kulturen wurden Kälteschocks von verschiedener Dauer ausgesetzt, die zwischen zwei und 11 Stunden variierten. Es wurden zwei Arten von Temperaturbehandlungen angewandt: Kontinuierliche Kühlung bei 4°C sowie alternierende Temperaturbehandlung, bei der Kälteperioden von 4°C mit Inkubationsperioden bei 37°C in halbstündigen Abständen abwechselten. Bei jedem Untersuchungstermin wurden die Gesamtzellzahlen und die einzelnen Mitosestadien bestimmt.

II Es konnte ein Einfluß der Temperaturbehandlung auf die Mitosen nachgewiesen werden.

III Sofort nach Beendigung der Temperaturbehandlung kam es zum Ansteigen der Mitoseraten.

IV Mit zunehmender Dauer der Temperaturbehandlung stieg die Gesamtmitoserate an. Alternierende Temperaturschocks ließen erkennen, daß bis zu einem gewissen Grad auch die Steilheit des Mitoseanstiegs durch die Länge der Temperaturbehandlung bestimmt wird.

V Unter der Kälteeinwirkung kommt es zu einer Arretierung der Mitosen in der Metaphase. Mitosen, die das Stadium der Metaphase überschritten haben, laufen während der Kälteeinwirkung bis zu Ende ab. Zellen im Stadium der Interphase werden am Eintritt in die Prophase gehindert.

VI Kälteeinwirkung von zunehmender Dauer geht einher mit fortschreitender Zerstörung der Mitosen. Dabei zeigen die Metaphasen eine größere Resistenz gegen die Kälte als die Prophasen.

VII Die prozentuale Berechnung läßt erkennen, daß nur ein verhältnismäßig geringer Synchronisationsgrad erreicht wurde.

Herrn Prof. Dr. W.D. Germer bin ich für die Fragestellung und für großzügige Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. W. Diefenthal und Herrn Dr. K.-O. Habermehl danke ich für methodische Anleitung und fördernde Kritik.

L I T E R A T U R

1. Adams, M.H.:
Synchronisation of cell division
Science 120, 793 (1954).-
2. Adolph, E.F. and S. Bayne-Jones:
Growth in size of microorganisms measured from
motion pictures. II *Bacillus megatherium*.
J. Cell. Comp. Physiol. 1, 409-427 (1932).-
3. Barber, H.N. and H.G. Callan:
The effects of cold and colchicine on mitosis in
the newt.
Proc. Roy. Soc. London, Ser. B 131 (1943).-
4. Barner, H.D. and S.S. Cohen:
The induction of thymine synthesis by T_2 infection
of a thymine requiring mutant of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 68, 80-88 (1954).-
5. Barner, H.D. and S.S. Cohen:
Synchronisation of division of a thymineless mutant
of *Escherichia coli*.
Federation Proceedings 14, 177 (1955).-
6. Barner, H.D. and S.S. Cohen:
Synchronisation of division of a thymineless mutant
of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 72, 115-123 (1956).-
7. Bayne-Jones, S. and E.F. Adolph:
Growth in size of microorganisms measured from
motion pictures. I *Yeast, Saccharomyces cerevisiae*.
8. Beam, C.A., R.K. Mortimer, R.G. Wolfe and C.A. Tobias:
The relation of radioresistance to budding in *Saccharomyces cerevisiae*.
Arch. Biochem. Biophys. 49, 110 (1954).-
9. Belehradek, J.:
Temperature and living matter, *Protoplasma Monographien* 8, p. 221-229.
Verlag Gebrüder Bornträger Berlin 1935.-
10. Brachet, J.:
The role of PNA in morphogenesis, in "The Nucleic
Acids" 2, by E. Chargaff, p. 478-486.
New York Acad. Press 1955.-
11. Bucciante, L.:
Ulteriori ricerche sulla velocita della mitosi
nelle cellule coltivate "in vitro" in funzione
della temperatura (dts. Zusammenfassung).
Arch. Exptl. Zellforschung 5, 21-22 (1928).-

12. Campbell, A.:
Repeated synchronisation of cell division in a long term adapting yeast.
Bacteriol. Proc., p. 40-41, Baltimore 1956.-
13. Campbell, A.:
Division synchronisation in a respiratory deficient yeast.
J. Bacteriol. 74, 559 (1957).-
14. Campbell, A.:
Synchronisation of cell division.
Bacteriol. Revs. 21, 263 (1957).-
15. Chalkley, H.W. and C. Voegtlin:
The chemistry of cell division. III Inhibition of cell division of *Amoeba proteus* by high dilutions of copper salts - antagonism of copper and glutathione.
Public Health Reports 47, 535-560 (1932).-
16. Chevrement-Comhaire, S. et M. Chevrement:
Action de températures subnormales suivies de réchauffement sur l'activité mitotique en culture de tissus. Contribut à l'étude de la préparation à la mitose.
Compt. Rend. Soc. Biol. 150 I, 1046-49 (1956).-
17. Christenson, E.:
Changes in free amino acids and proteins during cell growth and synchronous division in mass cultures of *Tetrahymena pyriformis*.
Acta Physiol. Scand. 45, 339 (1959).-
18. Cohen, S.S. and H.D. Barner:
Studies on unbalanced growth in *Escherichia coli*.
Proc. Nat. Acad. Sci. 40, 885-893 (1954).-
19. Dawson, J.A., W.R. Kessler and J.K. Silberstein:
Mitosis in *Amoeba proteus*.
Biol. Bulletin 72, 125-144 (1937).-
20. De Lamater, E.D.:
Bacterial chromosomes and the mechanism of division.
Bacterial anatomy, p. 215-260,
Cambridge University Press 1956.-
21. Diefenthal, W. und K.-O. Habermehl:
Zbl. Bakt. I. Orig. im Druck (1961).-
22. Earle, W.R., J.C. Bryant and E.L. Schilling:
Certain factors limiting the size of the tissue culture and the development of massive cultures.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 1000 (1954).-
23. Falcone, G. and W. Szybalski:
Biochemical study on the induction of synchronized cell division.
Exptl. Cell Research 11, 486-489 (1956).-

24. Fitz-Niggli, H.:
Vererbung bei Mensch und Tier, 2. ed.,
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1961.-
25. Firket, H.:
Mesures cytophotométriques de la synthèse d'acides
désoxyribonucléiques dans les cultures de tissus
soumises au refroidissement puis réchauffées.
Compt. Rend. Soc. Biol. 150 I, 1050-53 (1956).-
26. Frederic, J.:
Recherches sur le comportement du chondriome dans
les cultures de fibroblastes maintenues à tempéra-
ture subnormale.
Compt. Rend. Soc. Biol. 150 I, 1053-56 (1956).-
27. Fry, H.J.:
Studies on the mitotic figure.
V The time schedule of mitotic changes in developing
Arbacia eggs.
Biol. Bulletin 70, 89-99 (1936).-
28. Gerassimow, J.J.:
Die Abhängigkeit der Größe der Zelle von der Menge
ihrer Kernmasse.
Z. Allg. Physiol. 1, 220-258 (1902).-
29. Gey, G.O., F.B. Bang and M.K. Gey:
Responses of a variety of normal and malignant cells
to continuous cultivation, and some practical appli-
cations of these responses to problems in the biolo-
gy of disease.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 976 (1954).-
30. Hegarty, C.P.:
Physiological youth as an important factor in adap-
tive enzyme formation.
J. Bacteriol. 37, 145-152 (1939).-
31. Hegarty, C.P. and O.B. Weeks:
Sensitivity of Escherichia coli to coldshock during
the logarithmic growth phase.
J. Bacteriol. 39, 475-484 (1940).-
32. Hershey, A.D. and J. Bronfenbrenner:
Factors limiting bacterial growth.
III Cell size and "physiologic youth" in Bacterium
coli cultures.
J. Gen. Physiol. 21, 721-728 (1938).-
33. Hoffmann-Berling, H.:
Die Bedeutung des Adenosintriphosphat für die Zell-
und Kernteilungsbewegung in der Anaphase.
Biochim. Biophys. Acta 15, 234 (1954).-
34. Hotchkiss, R.D.:
Cyclical behaviour in pneumococcal growth and trans-
formability occasioned by environmental changes.
Proc. Nat. Acad. Sci. US 40, 49-55 (1954).-

35. Hughes, A.F.W.:
The effect of inhibitory substances on cell division.
Quart. J. Microscop. Sci. 91, 251-277 (1950).-
36. Hunter-Szybalska, M., W. Szybalski and E. DeLamater:
Temperature synchronisation of nuclear and cellular
division of *Bacillus megatherium*.
J. Bacteriol. 71, 17-24 (1956).-
37. Hutchens, J.O. and B. Podolsky:
Effect of nitrogen mustard on baker's yeast.
Federation Proceedings 11, 76 (1952).-
38. Jacoby, F., O.A. Trowell and E.N. Willmer:
Studies on the growth of tissues in vitro.
V Further observations on the manner in which cell
division of chick fibroblasts is affected by em-
bryo tissue juice.
J. Exptl. Biol. 14, 255-266 (1937).-
39. James, A.:
Synchronisation of cell division in amoebae.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 78, 501-514 (1959).-
40. Jeener, H. and R. Jeener:
Cytological study of *Thermobacter acidophilus* R 26
cultured in absence of deoxyribonucleosides or
uracil.
Exptl. Cell Research 3, 675-680 (1952).-
41. Katchman, B.J., W.O. Fetty and K.A. Busch:
Effect of cell division inhibition on the phosphate
metabolism of growing cultures of *Saccharomyces ce-
revisiae*.
J. Bacteriol. 77, 331 (1959).-
42. Kjeldgard, N.O., O. Maaløe and M. Schaechter:
J. Gen. Microbiol. 19, 607-616 (1958).-
43. Kokott, W.:
Zur Frage des Einflusses erhöhter Temperatur auf
die Mitosen in Gewebekultur.
Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 11, 484-490 (1930).-
44. Lambert, R.A. and E.M. Hanes:
Beobachtungen an Gewebeskulturen in vitro.
IV Physikalische Einflüsse auf das Wachstum von Ge-
weben in Kulturmedien.
Virchows Archiv 211, 89-116 (1913).-
45. Lambert, R.A.:
The influence of temperature and fluid medium on
the survival of embryonic tissues in vitro.
J. Exptl. Med. 18, 406-411 (1913).-

46. Lark, K.G., O. Maaløe and O. Rostock:
Cytological studies of nuclear division in
Salmonella typhimurium.
J. Gen. Microbiol. 13, 318-326 (1955).-
47. Lark, K.G. and O. Maaløe:
The induction of cellular and nuclear division in
Salmonella typhimurium by means of temperature shifts.
Biochim. Biophys. Acta 15, 345-356 (1954).-
48. Lea, D.E.:
Actions of radiations on living cells, VIII delayed
division, 2. ed., p. 282-306,
Cambridge Univ. Press, London and New York 1955.-
49. Lillie, R.D.:
Histopathologic technic and practical histochemistry,
p. 155, Mc Graw Hill Book Co., London 1954.-
50. Loveless, L.E., E. Spoerl and T.H. Weisman:
A survey of effects of chemicals on division and
growth of yeast and Escherichia coli.
J. Bacteriol. 68, 637-644 (1954).-
51. Maaløe, O. and K.G. Lark:
A study of bacterial populations in which nuclear
and cellular divisions are induced by means of
temperature shifts.
Recent developments in cell physiology,
Colston Papers 7, p. 159-170,
London Butterworth 1954.-
52. Maruyama, Y. and T. Yanagita:
G 16. Synchronous culture of Escherichia coli.
Bacteriol. Proc. 1955.-
53. Maruyama, Y. and T. Yanagita:
Physical methods of obtaining synchronous culture
of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 71, 542-546 (1956).-
54. Mazia, D. and D.M. Prescott:
Nuclear function and mitosis. Science 120, 120 (1954).-
55. Newton, A.A. and P. Wildy:
Parasynchronous division of HeLa cells.
Exptl. Cell Research 16, 624-635 (1959).-
56. Nickerson, W.J.:
Enzymatic control of cell division.
Nature 162, 241-245 (1948).-
57. Nihei, T., T. Sasa, S. Miyachi, K. Suzuki and
H. Tamiya: Change of photosynthetic activity of
Chlorella cells during their normal life
cycle.
Arch. Microbiol. 21, 156-166 (1954).-

58. Ugur, M., S. Winkler and D.O. McClary:
Desoxyribonucleic acid and the budding cycle in
the yeast.
J. Bacteriol. 66, 642 (1953).-
59. Pirson, A.:
Induced periodicity of photosynthesis and respira-
tion in Hydrodictyon. Research in photosynthesis,
p. 490-499,
ed. H. Gaffron, Interscience, New York 1957.-
60. Prescott, D.M.:
Relations between cell growth and cell division.
I Reduced weight, cell volume, protein content, and
nuclear volume of Amoeba proteus from division to
division.
Exptl. Cell Research 2, 328-337 (1955).-
61. Puck, T.T. and P.J. Marcus:
A rapid method for viable cell titration and clone
production with HeLa cells in tissue culture: The
use of x-irradiated cells to supply conditioning
factors.
Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 41, 432 (1955).-
62. Rapkine, L.:
Sur les processus chimiques au cours de la division
cellulaire (résumé).
Ann. Physiol. Physiochem. Biol. 7, 382 (1931).-
63. Rogers, L.A. and G.R. Greenbank:
The intermittant growth of bacterial cultures.
J. Bacteriol. 19, 181-190 (1930).-
64. Scherbaum, O.H.:
Synchronous division of microorganisms.
Ann. Rev. Microbiol. 14, 283-310 (1960).-
65. Scherbaum, O.H. and E. Zeuthen:
Induction of synchronous cell division in mass
cultures of Tetrahymena pyriformis.
Exptl. Cell Research 6, 221-227 (1954).-
66. Scott, D.B. McNair and E. Chu:
Synchronized division of growing cultures of
Escherichia coli.
Exptl. Cell Research 14, 166-174 (1958).-
67. Scott, D.B. McNair, E.D. DeLamater, E.J. Minsavage
and E. Chu: Sequences of metabolic events during
growth of synchronized bacteria.
Science 123, 1036 (1956).-
68. Spear, F.G.:
The effect of low temperature on mitosis in vitro.
Arch. Exptl. Zellforsch. 7, 484 (1928).-

69. Spoerl, E., L.E. Loveless, T.H. Weisman and R.J. Balske: Studies on cell division. II X-radiation as a division inhibiting agent. J. Bacteriol. 67, 394-401 (1954).-
70. Stoker, M.G.P. and A.A. Newton: The effect of Herpes virus on HeLa cells dividing parasynchronously. Virology 7, 438-448 (1959).-
71. Swann, M.M.: The control of cell division. Recent developments in cell physiology, Colston Papers 7, p. 185-196, London Butterworth 1954.-
72. Swann, M.M.: The control of cell division. I General mechanisms. Cancer Research 17, 727-757 (1957).-
73. Swann, M.M.: The control of cell division. II Special mechanisms. Cancer Research 18, 1118-1160 (1958).-
74. Szybalski, W. and M.E. Hunter-Szybalska: G 15. Synchronisation of nuclear and cellular division in *Bacillus megatherium*. Bacteriol. Proc. 1955.-
75. Tanya, H., T. Iwamura, K. Shibita, E. Hase and T. Nihei: Correlation between photosynthesis and light-independent metabolism in the growth of *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta 12, 23-40 (1953).-
76. Waymouth, C.: "The mitotic cycle", chapter 5. Ed. A. Hughes, London Butterworth 1952.-
77. Wildy, P. and A.A. Newton: Synchronous division of HeLa cells. Biochem. J. 68, 14P (1958).-
78. Zeuthen, E.: Growth as related to the cell cycle in single cell cultures of *Tetrahymena pyriformis*. J. Embryol. Exptl. Morphol. 1, 239-249 (1953).-
79. Zeuthen, E. and O. Scherbaum: Synchronous divisions in mass cultures of the ciliate protozoon *Tetrahymena pyriformis*, as induced by temperature changes. Recent developments in cell physiology, Colston Papers 7, p. 141-157, London Butterworth 1954.-

80. Zeuthen, E.:

Advances in biological and medical physics.

Artificial and induced periodicity in living cells.

Acad. Press, Inc., New York, N.Y. 1958.-

L E B E N S L A U F .

Am 16. Oktober 1937 wurde ich in Berlin-Charlottenburg geboren. Mein Vater war Angestellter und kam durch Kriegseinwirkung ums Leben. Meine Mutter, von Beruf Kindergärtnerin, hatte nach dem Kriege mich und zwei Brüder zu ernähren.

1944 wurde ich in Dresden eingeschult. Nach Abschluß der Grundschulausbildung besuchte ich von 1951-1955 die Ostberliner Franz-Mehring-Oberschule. Meine Bewerbung zum Medizinstudium an der Ostberliner Universität wurde abgelehnt. Daraufhin arbeitete ich im Ostberliner Städtischen Krankenhaus Herzberge für ein Jahr als Hilfspfleger, außerdem wiederholte ich 1956 nach einem Sonderkurs in Westberlin die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1956/57 begann ich, an der Freien Universität Berlin Medizin zu studieren. Nach dem Wintersemester 1958/59 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Während meines Studiums habe ich nicht an anderen Universitäten studiert. Mein medizinisches Staatsexamen legte ich im Dezember 1962 ab.

Ich habe in Berlin je einen Monat auf einer chirurgischen (Rudolph-Virchow-Krankenhaus) und gynäkologischen (Wenckebach-Krankenhaus), sowie zwei Monate auf inneren Stationen (Wenckebach-Krankenhaus) famuliert. In Britannien famulierte ich je einen Monat auf einer inneren und einer chirurgischen Station.

Im November 1960 wurde ich Doktorand bei Herrn Professor Dr. med. W. G e r m e r , Chefarzt der Inneren Abteilung des Städtischen Wenckebach-Krankenhauses in Berlin-Tempelhof.

Bisher habe ich noch keinen Versuch unternommen, an einer anderen Universität zu promovieren.

